

St. John's wort extracts having reduced chlorophyll and proanthocyanidin contents, useful as topical medicaments, e.g. for treating stomatitis, acne, viral infections or psoriasis

Patent Number: DE10131641
Publication date: 2002-06-27
Inventor(s): KOCH EGON (DE); ERDELMEIER CLEMENS (DE); HERRMANN JOACHIM (DE)
Applicant(s): SCHWABE WILLMAR GMBH & CO (DE)
Requested Patent: DE10131641
Application Number: DE20011031641 20010629
Priority Number(s): DE20011031641 20010629; DE20001064284 20001222
IPC Classification: A61K35/78
EC Classification: A61K35/78, C07C45/78
EC Classification: A61K35/78; C07C45/78+49/743
Equivalents: EP1345614; WO02051427

Abstract

Extracts (I) of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) having reduced contents of chlorophyll and proanthocyanidins are new. Independent claims are included for: (1) the preparation of (I), by extracting dried St. John's wort herb with a mixture of acetone and ethanol, then removing green pigments by filtration via an adsorbent; and (2) pharmaceutical compositions comprising (I) and conventional pharmaceutical auxiliaries for topical administration.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

Description

Die vorliegende Erfindung betrifft einen verbesserten und stabilen Extrakt aus den oberirdischen Teilen von *Hypericum perforatum* L. sowie diesen Extrakt enthaltende topische Arzneimittel, insbesondere Gele, zur Behandlung von Haut- und Schleimhautkrankheiten wie z. B. Akne, atopische Dermatitis, Neurodermitis, Psoriasis, Stomatitis, Gürtelrose, Lippenherpes, Warzen, Wunden, Verbrennungen sowie anderen bakteriellen und viralen Haut- und Schleimhautinfektionen und Hauterkrankungen die mit einer Zellproliferation und Entzündung einhergehen.

Hypericumextrakte werden seit vielen Jahren zur Behandlung von nervösen Störungen verwendet. Ihre Verwendung bei Depressionen und psychovegetativen Störungen hat in den vergangenen Jahren als Folge positiver klinischer Studienergebnisse stark zugenommen [W. E. Müller, A. Singer, M. Wonnemann, DAZ 139 (17), 49-58 (1999)]. Die EP-A-0 599 307 beschreibt Primärextrakte aus Johanniskraut. Diese Primärextrakte werden durch einfache Extraktion der Droge mit 96%igem bzw. 60%igem wässrigen Ethanol erhalten. In der DE-A-196 19 512 sowie DE-A-197 14 450 sind Extrakte beschrieben, die einen stabilen Gehalt des ansonsten sehr instabilen Johanniskraut Inhaltsstoffs Hyperforin aufweisen. Die WO 99/40905 beschreibt die Verwendung von Johanniskrautextrakten zur Behandlung und Prophylaxe von Demenzerkrankungen. Schliesslich werden in der DE-A-199 03 570 Hyperforinzubereitungen beschrieben, in denen das Hyperforin in Form eines Extraktes aus Johanniskraut vorliegt.

Die lokale Applikation von Hypericum-Extrakten - insbesondere in Form von Johanniskraut-Öl - zur Behandlung von Wunden, Ulzera, Verbrennungen, Myalgien, Prellungen etc. hat eine lange Tradition [P. Maisenbacher, Dissertation Uni Tübingen, 1991]. Diese erfahrungsmedizinischen Anwendungen erscheinen auf der Grundlage theoretischer Überlegungen und experimenteller Untersuchungen rational begründet. So gibt es zahlreiche Hinweise, dass Hypericum-Extrakte und einzelne Inhaltsstoffe über antivirale, antibakterielle, antiproliferative und entzündungshemmende Eigenschaften verfügen.

Als massgebliche Inhaltsstoffe mit antiviraler Aktivität in Hypericum-Extrakten wurden Hypericin und Pseudohypericin identifiziert [EP 0 256 452], Lavie, G.; Mazur, Y.; Lavie, D.; Meruelo, D. Med. Res. Rev. 15, (2), 111-119 (1995) [LAVIE, G.; VALENTINE, F.; LEVIN, B.; MAZUR, Y.; GALLO, G.; LAVIE, D.; WEINER, D.; MERUELO, D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, (15), 5963-5967 (1989)]. Ausser gegenüber Retroviren besitzen diese Naphodianthrone antivirale Eigenschaften auch für andere mit einer Lipidhülle ausgestattete Viren, z. B. Herpesviren. Die antivirale Potenz von Hypericin ist vollständig von einer photodynamischen Aktivierung abhängig bzw. wird unter dem Einfluss von sichtbarem Licht entscheidend verstärkt. Diese Eigenschaft prädestiniert diese Inhaltsstoffe deshalb für die lokale Anwendung bei Virusinfektionen der Haut. Antivirale Wirkungen wurden auch für Aceton- und Wasserextrakte aus Hypericum nachgewiesen, die vorwiegend Catechine und Flavon-Aglyka enthielten [Erdelmeier, C.; Koch, E.; Hörr, R. *Hypericum perforatum* L.-St. John's Wort, Chemical, Pharmacological and Clinical Aspects, in, *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 22, Atta-Ur-Rahman (ed.), Elsevier, Amsterdam, 2000]. Auch von diesen Inhaltsstoffen ist eine therapeutisch relevante antivirale Wirkung in erster Linie bei einer topischen Anwendung zu erwarten. In der Tat zeigte sich jetzt, dass erfindungsgemäss hergestellte Extrakte über antivirale Wirkungen verfügen, die wesentlich stärker ausgeprägt sind, als die von reinem Hypericin (siehe Beispiel 3). Gleichzeitig verfügen solche Extrakte über einen grossen therapeutischen Index, der den Unterschied zwischen den erwünschten antiviralen Eigenschaften und unspezifischen zytotoxischen Effekten kennzeichnet.

Antibakterielle Wirkungen von Hypericumextrakten sind sehr gut dokumentiert und werden vor allem auf den Gehalt an Hyperforin zurückgeführt. Hyperforin ist insbesondere wirksam gegenüber Gram-positiven Bakterien und besitzt antibakterielle Eigenschaften z. B. auch für Methicillin-resistente Staphylokokken, die wichtige Erreger von Hautinfektionen darstellen [Schempp, Ch. M.; Pelz, K.; Wittmer, A.; Schoepf, E.; Simon, J. C. Lancet 353, (9170), 2129-

2129 (1999)]. Dies erscheint bedeutsam, da z. B. eine enge Korrelation zwischen Streptokokken und Staphylokokken-Infektionen und der Induktion oder dem Wiederaufflammen von Psoriasis besteht. Wie jetzt überraschend gefunden wurde, sind die antibakteriellen Effekte eines erfindungsgemässen Extraktes aber wesentlich stärker, als aufgrund des Gehaltes an Hyperforin zu erwarten wäre. Das bedeutet, dass die erfindungsgemässen Extrakte andere wirksame antibakterielle Inhaltsstoffe enthalten oder der Effekt von Hyperforin durch solche Extraktbestandteile verstärkt wird.

Hypericine verfügen neben antiviralen Wirkung auch über antiproliferative Eigenschaften und werden deshalb gegenwärtig klinisch bei Tumorerkrankungen in Kombination mit einer photodynamischen Therapie geprüft. Verantwortlich für die Unterdrückung der Zellproliferation ist höchstwahrscheinlich die Hemmung verschiedener an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligter Proteinkinasen. Da auch dieser Effekt lichtabhängig ist, bietet sich für die therapeutische Nutzung dieser Wirkung ebenfalls eine topische Anwendung an. In erster Linie ist hierbei an die Behandlung der Schuppenflechte zu denken, die durch eine Hyperproliferation epidermaler Zellen charakterisiert ist.

Hyperforin besitzt ausserdem ausgeprägte antiphlogistische Eigenschaften, indem es z. B. die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe unterdrückt. Über entzündungshemmende Wirkungen verfügen auch die in den erfindungsgemässen Hypericumextrakten enthaltenen Flavonoide. Flavonoide verfügen insbesondere über antioxidative Eigenschaften und sind dadurch z. B. in der Lage, die gewebeschädigenden Wirkungen von reaktiven Sauerstoffradikalen, die von Leukozyten gebildet werden, zu unterdrücken. Darüber hinaus ist bekannt, dass Flavonoide eine Vielzahl von Enzymsystemen beeinflussen können, die wichtige zelluläre Reaktionen steuern, die an der Pathogenese der Psoriasis beteiligt sind, wie z. B. Zellproliferation und Immunantwort.

Die Psoriasis ist eine chronische Hauterkrankung, die durch eine Hyperproliferation und abnormale Differenzierung von Keratinozyten sowie eine Entzündung der Epidermis und der Dermis gekennzeichnet ist. Mit den Standardbehandlungsmethoden ist zwar eine vorübergehende Verbesserung der Symptome und auch eine langfristige Kontrolle der Erkrankung zu erreichen, eine komplette Abheilung wird in der Regel aber nicht erzielt. Alle bisher bekannten Therapieansätze weisen ausserdem mehr oder weniger schwerwiegende andere Nachteile (unangenehmer Geruch, Hautirritationen, erhöhtes Hautkrebsrisiko, Teratogenität etc.) auf. Es besteht deshalb weiterhin ein dringender Bedarf an wirksamen und nebenwirkungsarmen Methoden zur Behandlung der Psoriasis. Erfindungsgemäss wird dieses Bedürfnis durch die Verwendung von Extrakten aus oberirdischen Teilen von Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.) befriedigt, die wirksame Konzentrationen von Hypericin, Hyperforin und Flavonoiden enthalten.

Eine der meist verbreiteten Hauterkrankungen ist die Akne. Dabei handelt es sich um eine Entzündung der Talgdrüsen, die mit einem Untergang der Talgdrüsenfollikel einhergeht. Als auslösende Ursache der Akne werden androgene Hormone angesehen, die die Sekretproduktion in den Talgdrüsen stimulieren. Wenn gleichzeitig Abflussstörungen auftreten, kann es zu einer bakteriellen Besiedlung des Talgs mit nachfolgender perifollikulärer Entzündung, Abszessbildung, Einschmelzung des Gewebes und einer Fremdkörperreaktion kommen. Es gibt Hinweise, dass in der Haut von Aknekranken das männliche Geschlechtshormon Testosteron unter Einfluss des Enzyms 5 alpha -Reduktase verstärkt in die biologische stärkere Wirkform Dihydrotestosteron umgewandelt wird. Die Hemmung der 5 alpha -Reduktase stellt deshalb eine Möglichkeit zur Behandlung der Akne dar. Es wurde nun überraschend gefunden, dass erfindungsgemässe Extrakte und verschiedene darin enthaltene Inhaltsstoffe eine ausgeprägte Hemmwirkung auf dieses Enzym ausüben und deshalb in Verbindung mit den vorstehend erwähnten antibakteriellen und entzündungshemmenden Eigenschaften in hervorragender Weise zur Behandlung der Akne geeignet sind.

Aus der DE 198 54 446 A1 sowie aus der WO 00/30660 ist die Verwendung von Hyperforin und

Hypericin sowie diese Komponenten enthaltende Extrakte als Dermatika bekannt.

Diese Gesamtextrakte werden mit einem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Ethanol mit hohem Wasseranteil hergestellt. Erfahrungsgemäss enthalten solche Extrakte hohe Mengen an polyphenolischen Gerbstoffen (Proanthocyanidine), die sich mit der Zeit immer stärker braun verfärben und letztlich die Zubereitung kosmetisch inakzeptabel werden lassen. Dies gilt ebenso für die aus Pflanzenmaterialien in praktisch alle ethanolisch-wässrige Extrakte übergehenden grünen Pigmente (Chlorophylle). Diese Pigmente färben die Extrakte sehr stark und machen sie optisch unansehnlich. Solche Extrakte werden erfahrungsgemäss von Patienten nicht akzeptiert. Dies gilt insbesondere für den Fall der Applikation auf unbedeckte Körperteile.

Die vorstehend beschriebenen Nachteile können mit dem hier beschriebenen erfindungsgemässen Extrakt eliminiert werden. Überraschenderweise kann durch entsprechende Auswahl des Extraktionsmittels die Extraktion polyphenolischer Gerbstoffe weitgehend unterdrückt werden. Die im resultierenden Primärextrakt vorhandenen grünen Pigmente können durch Filtration über ein Adsorptionsmittel, z. B. ein Adsorberharz nahezu vollständig entfernt werden. Der letztlich erhaltene erfindungsgemässe Extrakt ist kosmetisch-optisch akzeptabel und kann einfach in Salben, Cremes, Gele etc. für externe Zwecke eingearbeitet werden.

Bei den erfindungsgemässen Zubereitungen mit Johanniskrautextrakt handelt es sich insbesondere um topisch zu applizierende, hydrophile oder lipophile homogene, einphasige Zubereitungen in Gelform (s. Beispiele 2a-2c). Diese Gele sind leicht auf die Haut aufzutragen und zu verreiben. Sie sind insbesondere kosmetisch akzeptabel, d. h. auch bei nicht von Kleidung bedeckten Körperteilen ist nach dem Auftragen keine ungewöhnliche Verfärbung der Haut festzustellen.

Des Weiteren weist der erfindungsgemässe Extrakt den Vorteil auf, dass er die pharmakologisch relevanten Inhaltsstoffe Hyperforin, Hypericine und Flavone in idealer Kombination, auch mengenmässig, enthält. So ist z. B. aufgrund der komplexen Pathogenese der Psoriasis nicht zu erwarten, dass Substanzen mit einem einzelnen, selektiven Wirkmechanismus erfolgreich für die Therapie dieser Erkrankung eingesetzt werden können. Diese Einschätzung wird durch die klinischen Erfahrungen mit den etablierten Therapieverfahren bestätigt. Der erfindungsgemässe Extrakt aus *Hypericum* zeichnet sich deshalb dadurch aus, dass er verschiedene für die Behandlung der Psoriasis und anderer Hauterkrankungen wichtige Wirkmechanismen (z. B. antiviral, antibakteriell, antiphlogistisch, antiproliferativ) in sich vereinigt, wobei der Kombinationseffekt der einzelnen Komponenten über die Wirkung der Einzelstoffe deutlich hinausgeht (synergistischer Effekt).

Zur Stabilisierung des Extraktes bzw. der pharmazeutischen Zubereitung können dem Extrakt und/oder der pharmazeutischen Zubereitung (z. B. Gel) Stabilisatoren in einer zur Stabilisierung des Hyperforins ausreichenden Menge zugesetzt werden. Bei den Stabilisatoren handelt es sich um die in der DE-A-196 19 512 beschriebenen Stabilisatoren, die vorzugsweise in einer Konzentration von 0,01% bis 5%, insbesondere 0,2% bis 1%, bezogen auf den Extrakt, vorliegen. Des Weiteren kann es sich bei den Stabilisatoren um die in der DE-A-199 03 570 beschriebenen Komplexierungsmittel in einer zur Komplexierung des Hyperforins ausreichenden Menge handeln. Auf diese beiden Druckschriften wird im Zusammenhang mit der Stabilisierung des Hyperforins ausdrücklich Bezug genommen.

Beispiel 1

(Herstellung eines erfindungsgemässen Extraktes)

3,1 kg *Hypericum* Droge wurden mit der 6,5-fachen Gewichtsmenge Aceton 95 Gew.-% - EtOH 92 Gew.-% 8 : 2 als Extraktionsmittel 1 min mit dem Ultraturrax homogenisiert (Lichtschutz). Die Lösung wurde danach im Laborextraktionsgefäss 1 h bei 50 DEG C extrahiert (N₂-Atmosphäre/Lichtschutz). Zur Extraktlösung wurden 5 g Ascorbinsäure zugegeben (1% auf die erwartete Extraktmenge). Die Lösung wurde über eine Filternutsche (Seitz Supra 1500)

abgesaugt. Der Drogenrückstand wurde noch zweimal mit der 6-fachen Gewichtsmenge Extraktionsmittel unter den gleichen Bedingungen extrahiert und filtriert.

Zu den vereinigten Filtraten wurden nochmals 5 g Ascorbinsäure zugegeben. Die Lösung wird schonend (max. 50 DEG C Wärmebad/Lichtschutz) zur Trockene eingengt.
Ausbeute: 490,02 g = 15,8% (Hyperforingehalt: 5,75%/Hypericingehalt: 0,45%).

Anschliessend wurde die Probe in 92 Gew.-%-Ethanol gelöst und durch eine Fritte G2 filtriert. Auf der Fritte blieb ein vernachlässigbarer Rückstand (ca. 2-3 g) zurück. 485 g des Extraktes wurden dann auf eine mit Diaion HP-20 gepackte geschlossene Chromatographie-Säule aufgegeben.

Chromatographiebedingungen

Probe: 485 g mit 92 Gew.-% EtOH auf 15 l verdünnt.

Säulengrösse: Füllhöhe 42 cm; Radius 10 cm

Säulenfüllung: Diaion HP-20, 0,3-0,8 mm Korngrösse

Eluens:

1. EtOH 92 Gew.-% (100 l; ->Fraktion 1)

2. EtOH 92 Gew.-% (40 l; ->Fraktion 2)

2. Aceton 100% (45 l; Chlorophyllfraktion)

Fluss: Trennung ca. 1 l/min.

Ausbeute

Die Fraktion 1 enthielt den Hauptteil des Extraktes (412 g = 85%; Hyperforingehalt 6,6%; Hypericingehalt 0,50%; Gesamtflavone 6,4%). Diese Fraktion wurde in den Beispielen der Erfindung als erfindungsgemässer Johanniskrautextrakt verwendet.

Beispiel 2a

Hypericumextrakt/Polyacrylat-Gel

Herstellung

Der Gelbildner (Polyacrylsäure, 1-3%, vorzugsweise 1,5%) wird in einer Mischung aus Wasser, Ethanol und Propylenglykol dispergiert. Der Extrakt (0,5-5%, vorzugsweise 2,5%) wird hinzugefügt und gemischt. Die Tromethaminlösung wird in kleinen Anteilen hinzugefügt und gemischt. Es bildet sich ein homogenes Gel. Zu dieser Basisrezeptur können Stabilisatoren wie z. B. Ascorbinsäure zugefügt werden.

Beispiel 2b

Hypericumextrakt-Tensidgel

Herstellung

Der Johanniskrautextrakt, das Tensid (Macrogol-Glycerol-Hydroxystearat), das Isopropylmyristat, das Neutralöl und das Propylenglykol werden homogen gemischt. Anschliessend wird das Wasser unter Rühren zugefügt. Es bildet sich ein homogenes Gel. Zu dieser Basisrezeptur können Stabilisatoren wie z. B. Ascorbinsäure zugefügt werden.

Beispiel 2c

Hypericumextrakt-Kohlenwasserstoffgel

Herstellung

Die Vaseline wird durch Erwärmen geschmolzen, das Propylenglykol zugefügt und gemischt. Der Johanniskrautextrakt wird zugegeben, gemischt und kaltgerührt. Es bildet sich ein homogenes Gel.

Beispiel 3

Antivirale Wirkung

Für die Prüfung auf antivirale Eigenschaften des erfindungsgemässen Extraktes und von Hypericin wurde der Herpes simplex-Virusstamm 1 (HSV-1), Stamm: McIntyre, (ATCC) verwendet.

Zur Beurteilung der "viruziden" Aktivität (Inaktivierungstest) wurden verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen in einem Volumen von 20 µl mit 980 µl Viruslösung gemischt und nach 1 h Inkubation auf eine Mikrotiterplatte mit 3 Tage alten, konfluenten Verozellen (Affennierenzellen) aufgebracht. Nach Inkubation der Platten für 5 Tage im

Brutschrank bei 37 DEG C erfolgte die visuelle Ablesung der Zellkulturen nach HSV-1-spezifischen zytopathogenen Veränderungen (CPE).

Zur Bestimmung der "virostatistischen" Aktivität (Inhibitionstest) wurden der erfindungsgemässe Extrakt oder Hypericin in verschiedenen Konzentrationen zu einem geschlossenen Verband von Verozellen in Mikrotiterplatten zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurden dann HSV-1 in einer Konzentration von 3000 TCID50/ml zugegeben. Die Platten wurden, anschliessend bei 37 DEG C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 48-72 h unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern und einer spezifischen Färbemethode.

Zur Beurteilung der zytotoxischen Wirkung wurden Verozellen für 7 Tage mit verschiedenen Konzentrationen von erfindungsgemässigem Extrakt und Hypericin im Brutschrank inkubiert. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte dann mit Hilfe des MTT- Tests nach einem publizierten Verfahren (Cinatl J. jr., Cinatl, J., Rabenau, H., Gümbel H.; Doerr, H. W. (1993); "In vitro anti-human immunodeficiency virus activity of 2',3'-dideoxynucleotides and their effect on clonal growth of hemopoietic cells from human bone marrow", Arzneimittel-Frsch./Drug Res. 43, 622-625).

Die Auswertung der zytotoxischen Konzentration (TC50) und der virusinhibitorischen Konzentration (IC50) erfolgten mittels linearer Regression. Zur Berechnung des therapeutischen Index wurde die Formel TC50/IC50 eingesetzt.

Ergebnisse der Untersuchungen im "Inaktivierungstest"

Die eingesetzte Virusmenge betrug $1,5 \times 10$ TCID50. Die "Virusinaktivierung" berechnet sich aus der Differenz der Ausgangsvirusmenge und den oben angegebenen Virustitern, n.b. = nicht bestimmt aufgrund von Zytotoxizität oder der in Vorversuchen bestimmten "virusinaktivierenden" Wirkung.

Ergebnisse der Untersuchungen im "Inhibitionstest" Wie aus den Untersuchungen ersichtlich ist, zeigte Hypericin wie erwartet eine deutliche "virusinaktivierende" Aktivität. Sie betrug bei 100 µg/ml ca. 4 log₁₀-Stufen. Überraschend bewirkte der erfindungsgemässe Extrakt aber eine wesentlich stärkere Wirkung, indem er selbst bei einer Konzentration von 10 µg/ml noch einen ähnlichen starken inhibierenden Effekt ausübt, wie das als wesentlicher antivirale Inhaltsstoff von Johanniskrautextrakten beschriebene Hypericin, das im erfindungsgemässen Extrakt nur in einem Anteil von etwa 0,5% enthalten ist. Die potente antivirale Wirksamkeit des erfindungsgemässen Extraktes wurde im "Inhibitionstest" bestätigt.

Beispiel 4

Antibakterielle Wirkung

Die antimikrobiellen Wirkungen gegenüber verschiedenen gram-positiven Bakterien wurde mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode bestimmt. In der Tabelle angegeben sind jeweils die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK)

Der erfindungsgemässe Extrakt zeigte an den getesteten gram-positiven Bakterien wesentlich stärkere antibakterielle Effekte, als aufgrund des Gehaltes an Hyperforin, das als wesentlicher Inhaltsstoff mit antibakteriellen Wirkungen angesehen wird, zu erwarten wäre.

Beispiel 5

Antiphlogistische Wirkung

Die antiphlogistischen Eigenschaften des erfindungsgemässen Hypericumextraktes und von isolierten Inhaltsstoffen wurden im Crotonöl-Ohrödemmodell an männlichen NMRI-Mäusen geprüft. Nach Einleitung einer Narkose durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg Natrium-Pentobarbital wurden die Testsubstanzen in 10 µl Aceton auf das rechte Ohr aufgetragen, während das linke Ohr zur Kontrolle nur mit 10 µl Aceton behandelt wurde. 30 min später wurde durch Auftragen von 50 µg Crotonöl in 10 µl Aceton auf das linke Ohr eine lokale

Entzündung ausgelöst. Nach 6 h wurden die Tiere euthanasiert und die Hemmung der Entzündungsreaktion wurde durch Wiegen eines ausgestanzten Gewebestücks aus beiden Ohren nach folgender Formel quantifiziert: $[1 - (GT/GL)] \times 100$, dabei handelt es sich bei GT bzw. GL um die Gewichtsdiﬀerenz zwischen dem rechten und linken Ohr von Tieren die mit Testsubstanz (GT) bzw. nur dem Lösungsmittel (GL) behandelt wurden.

Die Hemmung der Akkumulation neutrophiler Granulozyten im entzündeten Gewebe wurde durch die Bestimmung von Myeloperoxidase (MPO) in den Ohrhomogenaten ermittelt. Dazu wurden die Biopsieproben in 1 ml Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB)-Puffer aufgenommen, mit einem Glashomogenisator bei 4 DEG C homogenisiert und anschliessend für 10 sec in einem Sonicator beschallt. Nach einer Zentrifugation bei 4 DEG C mit 3000 g für 10 min wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei -70 DEG C aufbewahrt. Die MPO-Bestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten nach Zugabe von H₂O₂ und dem Indikator O-Dianisidin-Dihydrochlorid als kinetische Messung über einen Zeitraum von 5 min bei 450 nm. Die Auswertung erfolgte gegenüber einer Standardkurve mit Meerrettich-Peroxidase und wurde ermittelt als mU Enzymaktivität pro mg Gewebe.

Die Ergebnisse der Untersuchungen nach Applikation von jeweils 250 µg Testsubstanz bzw. 1000 µg des erfindungsgemässen Extraktes auf das linke Ohr sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Der erfindungsgemässe Extrakt wurde bei der vorstehend beschriebenen Untersuchung in einer Menge von 1000 µg eingesetzt. Wie sich aus Beispiel 1 ergibt, enthält der verwendete erfindungsgemässe Extrakt nach Beispiel 1 (Fraktion 1) 6,3% Hyperforin als Wirkstoff mit dem mengenmässig grössten Anteil im Extrakt. 1000 µg Extrakt entsprechen somit 63 µg Hyperforin. Die Vergleichstestsubstanzen wiederum wurden in einer Menge von 250 µg verabreicht. Dies bedeutet, dass diese Testsubstanzen in etwa der vierfachen Menge in Bezug auf Hyperforin im Extrakt verabreicht wurden. Trotz dieser Tatsache zeigt der erfindungsgemässe Extrakt im Vergleich zu Hyperforin als Testsubstanz eine deutlich bessere Hemmung. Hierin zeigt sich wiederum der synergistische Effekt zwischen Hyperforin und anderen wirksamkeitsrelevanten Inhaltsstoffen im erfindungsgemässen Extrakt. Damit wird deutlich, dass für die positiven pharmakologischen Eigenschaften die Summe der Einzelverbindungen wichtig ist, wobei ganz offensichtlich bestimmten Flavonoiden (z. B. Amentoflavon, Biapigenin, Kämpferol, Luteolin, Quercetin) eine besondere Bedeutung zukommt.

Beispiel 6

Proliferation von humanen Keratinozyten (HaCaT-Zellen)

Der Einfluss des erfindungsgemässen Extraktes und verschiedener Inhaltsstoffe auf die Proliferation von humanen Keratinozyten wurde unter Verwendung der Zelllinie HaCaT ermittelt. Die Zellen (10.000-15.000) wurden in 200 µl DMEM mit 5% fötalem Kälberserum in 96-Well F-Form Mikrotiterplatten ausgesät und für 24 h in Anwesenheit der Testsubstanzen bei 37 DEG C in einem Brutschrank inkubiert. Die Zellproliferation wurde durch Messung des Einbaus von H-Methyl-Thymidin (0,5 µCi/Well) während der letzten 6 h in Kultur bestimmt.

Wie aus den dargestellten Ergebnissen deutlich wird, beruhen die antiproliferativen Eigenschaften des erfindungsgemässen Extrakts ganz offensichtlich auf der Kombinationswirkung von Hypericin und Hyperforin sowie bestimmter Flavonverbindungen, z. B. Isoquercitrin und Luteolin.

Beispiel 7

Hemmung der 5 alpha -Reduktase

Untersuchungen zur Hemmung der 5 alpha -Reduktase wurden an Zellen der humanen Prostatakarzinom-Zelllinie DU 145 durchgeführt. Die Zellen (250.000) wurden in 5 ml RPMI 1640-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und bei 37 DEG C in einem Brutschrank inkubiert. Nach 4 Tage wurde das Medium gegen RPMI 1640 mit Zusatz von 10% Charcoalstripped FKS ausgetauscht. Am folgenden Tag wurden die Testsubstanzen

und C-Testosteron zugegeben und weitere 18 h später die Zellüberstände abgenommen. Die Zellüberstände wurden mit 2,5 ml Ethylazetat gemischt und dann 10 min mit 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und in ein Glasröhrchen überführt. Die Extraktion wurde anschliessend durch erneute Zugabe von 2,5 ml Ethylazetat wiederholt. Die vereinigten organischen Phasen wurden bei 37 DEG C unter N₂-Begasung zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 50 µl Ethylazetat aufgenommen und dann auf einer Kieselgel 60 TLC-Platte zweimal mit Ethylazetat/Cyclohexan (1 : 1) als Laufmittel aufgetrennt. Die gebildeten Testosteron-Metaboliten wurden mit Hilfe eines Linear-Analysers lokalisiert und die Hemmung der 5 alpha -Reduktase anhand des Dihydrotestosteron-Peaks im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt.

Der erfindungsgemässe Extrakt zeigt eine ausgeprägte Hemmwirkung auf die 5 alpha -Reduktase. Die verwendete Konzentration an Testsubstanzen von 30 µg/ml entspricht der Konzentration an Hyperforin, dem mengenmässig wichtigsten Inhaltsstoff im erfindungsgemässen Extrakt gemäss Beispiel 1, Fraktion 1.

Im Gegensatz zum erfindungsgemässen Extrakt (500 µg/ml) erwies sich Hyperforin bei der seinem Anteil am Gesamtextrakt entsprechenden Konzentration von etwa 30 µg/ml als zytotoxisch und wurde deshalb nur bei einer Konzentration von 5 µg/ml geprüft. Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass selbst bei den geprüften hohen Konzentrationen der Einzelstoffe, die deutlich über ihren jeweiligen Anteil am erfindungsgemässen Extrakt hinausgehen, keine dieser Verbindungen eine Wirkung entfaltete, die der des Gesamtextraktes überlegen war. Die Gesamtwirkung des erfindungsgemässen Extraktes ist deshalb nur mit der Kombinationswirkung der enthaltenen Inhaltsstoffe erklärbar.

Beispiel 8

(Stabilität der Wirkstoffe, insbesondere Hyperforin in den erfindungsgemässen Zubereitungen)
Auch das bekanntermassen chemisch instabile Hyperforin ist in einem erfindungsgemässen Gel gemäss Beispiel 2a vollständig enthalten, wie durch quantitative Bestimmung des enthaltenen Hyperforins gezeigt werden kann, d. h. bei der Herstellung des Gels gibt es keine Zersetzung.

Claims

1. Extrakt aus *Hypericum perforatum* L. mit abgereichertem Chlorophyllgehalt und mit abgereichertem Gehalt an Proanthocyanidinen.
2. Extrakt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die für Chlorophylle typischen Absorptionsbanden im VIS-Spektrum dieses Extraktes zwischen 600 und 700 nm stark vermindert sind oder fehlen, und dadurch gekennzeichnet, dass HPLC-analytisch keine Signale oder nur sehr stark verminderte Signale sichtbar sind, die auf Proanthocyanidine und Chlorophylle hinweisen.
3. Extrakt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Hyperforingehalt von mindestens 2%, einen Gesamthypericingehalt von mindestens 0,2%, und einen Gesamtflavongehalt von mindestens 2% aufweist.
4. Extrakt nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Hyperforingehalt von mindestens 4%, einen Gesamthypericingehalt von mindestens 0,4%, und einen Gesamtflavongehalt von mindestens 4% aufweist.
5. Extrakt nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass er einen Hyperforingehalt von 4-8%, einen Gesamthypericingehalt von 0,4-1,0%, und einen Gesamtflavongehalt von 4-8% aufweist.
6. Extrakt nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass der Extrakt des Weiteren einen Stabilisator in einer zur Stabilisierung des Hyperforingehalts ausreichenden Menge enthält.
7. Extrakt nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ascorbinsäureester, organischen Thiolverbindungen, wie Cystein und Glutathion und Komplexierungsmitteln, wie cyclischen Oligosacchariden, Cyclodextrinen, Kieselsäuren, Zitronensäure, Zuckeralkoholen, Zellulosederivaten, Polyvinylpyrrolidon oder Vinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymeren oder Gemischen davon.
8. Verfahren zur Herstellung eines Extraktes nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass getrocknete Johanniskrautdroge mit einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Ethanol extrahiert wird und anschliessend grüne Pigmente durch Filtration über ein geeignetes Adsorptionsmittel abgetrennt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittelgemisch 95 Gew.-% Aceton und 92 Gew.-% Ethanol umfasst.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittelgemisch 95 Gew.-% Aceton und 92 Gew.-% Ethanol in einem Verhältnis von 8 : 2 umfasst.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Adsorptionsmittel ein Adsorberharz verwendet wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass dem Extrakt ein Stabilisator zugesetzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ascorbinsäure, Ascorbinsäurederivaten, wie Ascorbinsäureester, organischen Thiolverbindungen, wie Cystein und Glutathion und Komplexierungsmitteln, wie cyclischen Oligosacchariden, Cyclodextrinen, Kieselsäuren, Zitronensäure, Zuckeralkoholen, Zellulosederivaten, Polyvinylpyrrolidon oder Vinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymeren oder Gemischen davon.
14. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend einen Extrakt nach einem der Ansprüche 1-7 und pharmazeutisch übliche Hilfsstoffe zur topischen Applikation.
15. Gel, enthaltend einen Extrakt nach einem der Ansprüche 1-7 sowie eine Gelgrundlage.

16. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch 14 bzw. eines Gels nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Extrakt und die pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffe und/oder die Gelgrundlage zusammen mit einem Stabilisator für Hyperforin vermischt werden.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Stabilisator ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Ascorbinsäure, Ascorbinsäurederivaten, wie Ascorbinsäureester, organischen Thiolverbindungen, wie Cystein und Glutathion und Komplexierungsmitteln, wie cyclischen Oligosacchariden, Cyclodextrinen, Kieselsäuren, Zitronensäure, Zuckeralkoholen, Zellulosederivaten, Polyvinylpyrrolidonen oder Vinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymeren oder Gemischen davon.

18. Verwendung eines Extraktes nach einem der Ansprüche 1-7 oder einer pharmazeutischen Zubereitung nach Anspruch 14 oder eines Gels nach Anspruch 15 zur topischen Behandlung von Schleimhautirritationen, wie Stomatitis, von Akne, von viralen Infektionen, wie Lippenherpes, Gürtelrose, Warzen, Windpocken sowie Psoriasis.